

# 示差走査熱量測定と蛍光分光測定による脂質-メ チン系の研究

著者	兒玉 篤治
号	54
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	理博第2590号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/56809">http://hdl.handle.net/10097/56809</a>

氏名・(本籍)	こ だま あつ じ 兒 玉 篤 治
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2 5 9 0 号
学位授与年月日	平 成 22 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)物理学専攻
学位論文題目	示差走査熱量測定と蛍光分光測定による脂質-メリチン系の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 須 藤 彰 三 教 授 大 木 和 夫 教 授 早 川 美 徳 (教育情報基盤センター) 准教授 遊 佐 剛, 宮 田 英 威

## 論 文 目 次

概要	1
目次	5
第 1 章 序論	6
1.1 生体膜	6
1.1.1 生体膜とは	6
1.1.2 生体膜の構造	6
1.2 リン脂質	8
1.2.1 リン脂質の基本構造	8
1.2.2 リン脂質の集合体と分子形状	8
1.2.3 リポソーム	10
1.2.4 脂質の相転移	11
1.3 膜タンパク質の機能と脂質膜	15
1.3.1 イオンチャネルと脂質膜に関する実験	15
1.4 抗菌性ペプチドとメリチン	16
1.4.1 抗菌性ペプチドとは	16
1.4.2 メリチン	18
第 2 章 論文の目的	20
2.1 本研究の背景と目的	20
2.1.1 PE を豊富に含む細菌に対するメリチンの作用	20
2.1.2 PE 導入により膜タンパク質が受ける影響	20
2.1.3 van't Hoff の式と固溶体での凝固点降下の式の畳み込みによる DSC サーモグラムの再現	21
第 3 章 不純物を添加した脂質膜の DSC 理論曲線	23

3.1 背景	23
3.2 示差走査熱量測定と比熱曲線の理論	23
3.2.1 示差走査熱量測定の原理	23
3.2.2 不純物がない脂質膜のDSC 曲線	25
3.2.3 添加物が水相に分配することを考慮しない場合のDSC曲線	30
3.2.4 添加物が水相に分配することを考慮する場合のDSC理論曲線	32
3.2.5 van't Hoff の式と凝固点降下の式の畳み込みによるDSC曲線	36
第4章 メリチン-ホスファチジルエタノールアミン膜系の研究	40
4.1 背景と目的	40
4.2 実験材料	42
4.2.1 試料	42
4.2.2 試料の調製	42
4.2.3 リン定量	43
4.2.4 リボソームの作成	43
4.3 実験方法	44
4.3.1 示差走査熱量測定	44
4.3.2 解析方法	45
4.3.3 膜環境感受性色素 Laurdan による蛍光分光測定	47
4.3.4 トリプトファン残基の蛍光分光測定	52
4.4 結果	56
4.4.1 DSC 測定	56
4.4.2 トリプトファン残基の蛍光測定によるメリチンの環境測定	67
4.4.3 環境感受性色素 Laurdan による DMPC 膜及び DMPE 膜に対するメリチンの効果	70
4.4.4 DMPC 膜及び DMPE 膜とメリチンの相互作用	74
4.4.5 DMPC/DMPE (1:1) 二成分系へのメリチン添加に伴う相の振る舞い	76
4.5 考察	79
4.5.1 ディスクミセルでのメリチンと膜界面に平行に配向したメリチンはどちらが親水的なのか	79
4.5.2 メリチンの配向は何によって決まるか	79
4.6 本研究のまとめ	81
4.7 今後の課題	81
第5章 付録	83
5.1 本実験で用いた脂質の構造式	83
5.2 アミノ酸の表記について	85
5.3 リン脂質2成分系に対するメリチンの効果	86
5.3.1 PC 同士の混合	87
5.3.2 PE と PC の混合	90
5.3.3 メリチンと脂質2成分系との相互作用のまとめ	91
謝辞	
参考文献	

# 論文内容要旨

## はじめに

細胞には多くの細胞小器官が存在し、多くの細胞小器官は膜構造により形成されている。この膜構造の総称が生体膜であり、主にリン脂質を主要構成要素とする脂質二重膜層と、その表面や内部に存在する膜タンパク質により構成されている。このような生体膜に強く作用する物質に膜作用性ペプチドが存在する。膜作用性ペプチドには、親水性のアミノ酸と疎水性のアミノ酸の領域が分かれる $\alpha$ ヘリックス構造を形成するものが存在し、このような構造をとると分子内に両親媒性を獲得し、生体膜に作用することが可能になる。このような膜作用性ペプチドは生体膜に作用し、膜に孔を形成したり、断片化を引き起こしたりする。そのため、膜作用性ペプチドを細菌の細胞膜に作用させて、抗生物質として利用しようという研究が行なわれている。ところで、細菌を構成する脂質は細菌の種類により異なり、黄色ブドウ球菌ではホスファチジルグリセロール(PG)が最も多く、一方、大腸菌ではホスファチジルエタノールアミン(PE)が最も多い。膜作用性ペプチドと細菌の生体膜との相互作用で最も重要なのは、最も多く含まれる脂質との相互作用であると考えられ、また、その相互作用で重要となるのが膜に対するペプチドの配向である。過去の研究では、細菌の生体膜のモデルとしてPGが、我々哺乳類の生体膜のモデルとしてホスファチジルコリン(PC)が用いられてきた。これらの系では、膜に孔を形成するモデルが幾つか提唱されており、そのモデルでは膜面に対しペプチドが縦に配向している。また、ペプチドの濃度がさらに高い領域では膜のディスクミセル化に伴う断片化が報告されている。一方、生体膜のモデルとしてPEを用いた研究は非常に少ない。しかし、膜作用性ペプチドの大腸菌に対する効果を検討する上で、ペプチドとPEの作用は非常に重要である。本研究では、膜作用性ペプチドとしてメリチンを用いた。そして、脂質膜とペプチドの作用においての重要なファクターとなる、膜に対するペプチドの配向に注目し、PE膜に対するメリチンの配向を明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

本実験ではPCとPEを比較する形で実験を行なっている。PCとPEの違いは親水性頭部に求められ、PCに比べてPEの頭部は小さく、分子の形がPCが円筒形に近いのに対しPEはコーン型に近い形をしている。PCにDMPCを、PEにDMPEを用い、それぞれのボルテックス法で調製した多重層膜リポソームに対しメリチンを作用させた。実験は示差走査熱量測定(DSC)、メリチンのトリプトファン残基及び膜環境感受性色素Laurdanを用いた蛍光測定を行った。DSCでは脂質膜にゲル-液晶相転移などの相構造の変化が起きると、その転移エンタルピーと転移の協同性(何分子が同時に転移を起こすか)に応じたピークが現れる。本研究ではメリチンの濃度に応じてそのピークがどのような変化をするのかに注目した。蛍光測定で用いたトリプトファン残基の蛍光スペクトルは周囲の極性によりそのピーク波長( $\lambda_{\max}$ )が変化する。親水的な環境にあると $\lambda_{\max}$ が長波長側にシフトし、疎水的な環境では短波長側にシフトする。本実験では水中に分散させたメリチン(非常に親水的な環境)のトリプトファン残基の $\lambda_{\max}$ を基準にした。また、蛍光測定で用いたLaurdanは脂質膜に選択的に分配し、周囲の極性変化を捉えられる蛍光色素である。脂質膜内においては発色団の周囲にどの程度水分子が侵入しているかをそのスペクトル変化から見積もることができる。実験ではそのスペクトル変化を定量化するためにGeneralized Polarization(GP)[1]を導入した。GP値はその値が高いほど膜内に侵入している水分子が少ないことを示す。

## 結果

【示差走査熱量測定】DMPC、DMPEそれぞれのメリチン添加に対するサーモグラムの振る舞いを検証するために、理論式としてJ.M.Sturtevantの式を導入した。この式では、脂質膜の転移温度と転移ピーク幅が、膜に対する不純物のゲル相と液晶相への分配率により変化する。不純物が液晶相に分配しやすい場合、転移温度は不純物の濃度が増すと次第に降下し、転移幅も広くなる。DMPEのサーモグラムの変化は比較的この変化と似ていた。このことは、メリチンがある程度膜内に均一に分布し、特異的な相互作用をもたない理想的な不純物として振舞っていることを示唆している。一方、DMPCの場合、特にメリチンの濃度が5mol%以上で、転移温度がわずかに高温側にシフトし、また、転移幅も異常に広くなった。これは、転移の協同性の低下を意味しており、ディスクミセルの形成を示唆していると考えられる。また、DMPC、DMPEについてメリチン添加濃度を固定し、DSCの走査回数に対する依存性を調べたところ、DMPCに依存性は見られなかったものの、DMPEでは走査回数が増すに従い、転移温度の降下と転移幅の広幅化が見られた。これは、DMPC/Melittin系では、系が比較的早く平衡状態に達するのに対し、DMPE/Melittin系では、系が平衡状態に達するのが遅いことを示している。DMPE/Melittin系のようにサーモグラムが走査回数依存性をもつような系はかなり特殊な系だと言っていることができるが、DMPE/Melittin系のサーモグラムの変化はメリチンが次第に膜内に侵入したことを示唆していると考えられる。そこで、走査回数の少ない段階でメリチンはどこに存在していたのかを調べるために以下の蛍光測定を行なった。

【トリプトファンの蛍光測定】DMPC/Melittin系では $\lambda_{\max}$ は330nmから342nmに存在し、メリチンの濃度が高いほど $\lambda_{\max}$ は長波長側に存在した。一方、DMPE/Melittin系では $\lambda_{\max}$ は345nm付近に存在した。また、水中に分散させたメリチンでは $\lambda_{\max}$ は355nmに位置した。DMPCではメリチンの濃度が高くなるとディスクミセル構造が形成されることが報告されている。メリチンの濃度が低い場合には膜構造が維持され、メリチンは膜内に存在しており、濃度が高い場合にはディスクミセルが存在し、ディスク状の膜の側面をメリチンが覆っているという描像を考えれば、DMPC/Melittin系のメリチンの濃度に依存した $\lambda_{\max}$ の振る舞いは過去の報告と矛盾しない。一方、DMPE/Melittin系の $\lambda_{\max}$ はDMPC/Melittin系と比べてかなり長波長側に存在し、特に、DMPC/Melittin系においてメリチンの濃度が低濃度である場合にメリチンが膜内に存在しているという報告から判断して、DMPE/Melittin系においてメリチンは膜内に存在していないと考えられる。しかし、水中の非常に親水的なメリチンと比較した場合に、 $\lambda_{\max}$ はかなり短波長側にあるから水中にあることは否定でき、膜と相互作用していることは間違いないと考えられる。

【Laurdanの蛍光測定】膜に対するメリチンの配向により、膜内への水分子の侵入に変化が起こるのであると考え、DMPC/Melittin系、DMPE/Melittin系についてGP値を求めた。DMPC/Melittin系では特にメリチンの濃度が5mol%以上での液晶相でのGP値が、5mol%以下と比較して高くなった。これは、ディスクミセルの構造を考えた場合に、ディスクミセルの膜はゲル相の膜に似た状態にあり、このような構造が高温側まで残っていると考えれば説明できるが、ディスクミセルが実際に50℃というかなりの高温でも維持されるのかは不明である。一方、DMPE/Melittin系では特に相転移近傍のGP値がメリチン添加により高くなった。これは、メリチン添加により膜内への水分子の侵入が妨げられたことを示唆しており、トリプトファンの蛍光スペクトル測定の結果と合わせて考えると、メリチンは膜の界面に平行に配向することを示唆していると考えられる。

## まとめ

以上の実験から、メリチンはDMPE膜に対し膜界面に平行に配向することが明らかとなった。ただし、系の昇温と冷却を繰り返すことでメリチンが膜内に侵入することも分かった。メリチンがDMPE膜の膜界面に平行に配向するという結果は、 $\alpha$ ヘリックス構造をとるペプチドの抗菌性が膜面に対し縦に配向する

ことにより生じることを考えれば、大腸菌などのPEを主な構成脂質とする細菌に対してメリチンの抗菌性は弱いことを意味している。そのため、大腸菌などに対しては $\beta$ シートなどの他の二次構造をとるペプチドやメリチンのアミノ酸を置換するなどの検討が必要であると考え。また、生体膜の物性の制御に脂質分子が密接に関わっているという報告がある。生体内にはPCをPEに変換する酵素が存在しているが、メリチンを膜タンパク質のモデルと考えると、PCのようなペプチドが膜内に配置する脂質に対し、PEのようにペプチドが膜界面に存在するような脂質を導入することで、膜物性を変化させて膜タンパク質の高次構造の変化を誘起し、活性の調節が行われるという機構が考えられる。PCが円筒形に近い分子形を、PEがコーン型に近い分子形をしていることから、生体が脂質の分子形の違いを積極的に利用していると考えられる。

#### 参考文献

1. T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo and E. Gratton, Biophys. J., 57, 1179-1186, 1990
2. J.M.Sturtevant, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3963-3967, 1982

## 論文審査の結果の要旨

兒玉篤治は物理学の視点で生物機能を解明するために、生命の基本単位である細胞を構築する生体膜に注目し、膜作用性抗菌性ペプチドから蜂毒のメリチンを取り上げて研究した。生体膜は脂質と蛋白質を主要な構成成分とし、水中で自発的に二次元平面を形成した脂質分子に、遺伝情報に従って合成された膜蛋白質が挿入して構築される。動物細胞ではホスファチジルコリン(PC)が主要なリン脂質であり、PCで調製した脂質膜での研究が行われている。一方、大腸菌では膜脂質はホスファチジルエタノールアミン(PE)であり、メリチンとの相互作用の研究はほとんど行われていない。大腸菌O157による感染症やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌など従来の抗生剤が効かない多剤耐性細菌の感染症が問題となっている。兒玉は抗菌性ペプチドのメリチンを大腸菌の感染症に使用する可能性を調べるために、メリチン分子がPE膜にどのように作用するかをメリチンが $\alpha$ ヘリクス構造でPE膜に作用するとき'孔形成'と'膜破壊'で重要となる脂質膜内でのメリチン分子の配向に注目し、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)膜を用いて研究した。比較のために脂肪酸部分が同一で、極性頭部だけが異なるDMPC膜も用いた。研究方法では膜を形成する脂質分子の統計的な集団が示す相転移と相分離を示差走査熱量計で測定し、不純物の分布が及ぼす影響の理論的な解析も行った。メリチン26残基のアミノ酸中のトリプトファンの蛍光がその環境で変化する発光波長も測定した。膜内への水分子の浸入を測定できる環境感受性蛍光色素Laurdanを用いた測定も行った。メリチンはDMPE系のDSC測定とその理論的な解析ではDMPE膜内に均一に分布し、特異的な相互作用がないことを示した。トリプトファンの蛍光測定ではDMPC膜ではメリチンは膜内に存在し、高濃度ではディスクミセルが形成されたことを示す変化があり、DMPE膜では水中ではなくDMPC膜内の存在状態とは異なる形で脂質膜と相互作用していることが示唆された。DSCの昇温と高温の走査を繰り返したときDMPCは速やかに平衡状態に達したのに対してDMPE膜では実験の走査回数の範囲内では平衡に達せずメリチンのDMPE膜への侵入過程はかなり遅いことを示した。

以上の研究内容は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、兒玉篤治提出の博士論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。